

Реакционная смесь для ПЦР Basic, 2x (содержит краситель для нанесения на гель)

Смесь для ПЦР Basic подходит для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Готовая 2-х кратная реакционная смесь содержит все необходимые компоненты для проведения ПЦР, ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации (содержит Hot-start полимеразу). Реакционная смесь для ПЦР Basic создана для рутинных задач по клонированию и других задач, требующих дальнейшего использования продукта ПЦР после амплификации (смесь не содержит UDG/dUTP). Благодаря высокой плотности смеси и наличию в ней красителя, образец перед нанесением на гель не нужно смешивать с буфером для нанесения. Объем смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объемом 20 мкл.

Состав реакционной смеси: HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер (содержит Mg²⁺), красители ксиленцианол и бромфеноловый синий для легкого нанесения на гель.

Совместимость с оборудованием: совместим с амплификаторами любого типа.

Возможные приложения: стандартная ПЦР, ОТ-ПЦР, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования и др.

Протокол

1. Разморозьте реакционную смесь, тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.
2. Смешайте компоненты реакции согласно приведённой ниже таблице в указанной последовательности из расчёта на (N+0,1N) реакций, где N — необходимое число реакций. Готовую смесь перемешайте и сбросьте капли центрифугированием.

! Объем реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объем реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

Расчет на 1 реакцию объемом 20 мкл:

Компонент	Объем	Примечание
2x Реакционная смесь Basic	10 мкл	
Прямой праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 250–750 нМ)
Обратный праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 20 мкл	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.3)
Общий объём реакции	20 мкл*	

** при использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением*

приведенных пропорций

- В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.

Программа амплификации:

Для расчёта температуры плавления (T_m) праймеров рекомендуется использовать стандартные инструменты, работающие по алгоритму Nearest-Neighbor (SantaLucia J Jr., 1998). Температура отжига праймеров рассчитывается по формуле $T_a = T_m - 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Если температура отжига праймеров $\geq 60 \text{ }^\circ\text{C}$

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	40
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	60–72 °C	30–60 сек	

- Если температура отжига праймеров $< 60 \text{ }^\circ\text{C}$

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	40
Отжиг праймеров (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	55–59 °C	10–15 сек	
Элонгация	72 °C	15–30 сек	

- Проанализируйте результаты ПЦР методом гель-электрофореза. Для нанесения образцов в лунки геля добавление в пробу буфера для нанесения не требуется.

! Для детекции продуктов амплификации на агарозном геле используйте бромистый этидий или более чувствительный и менее токсичный реагент [dsGreen](#).

! При необходимости хранить продукты амплификации при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.